SNI 01-2338-1991

Standar Nasional Indonesia

Produk perikanan
Penentuan staphylococcal entrotoksin

ICS

Badan Standardisasi Nasional

4.2.4 Pindahkan isi petridish ke 50 ml tabung sentrifugal dengan bantuan stik kayu atau sejenisnya.

4.2.5 Pisahkan agar dan organisme dengan kecepatan sentrifugasi yang tinggi (misalnya, 10 menit pada 32.800 x 9).

4.2.6 Pisahkan larutan jernihnya terhadap adanya enterotoksin dengan mengisi spot (ruangan) pada slide gel diffusion assembly seperti dijelaskan pada 4.3 di bawah ini.

4.3 Tes slide gel diffusin.

4.3.1 Penyiapan kertas pencatatan.

4.3.1.1 Gambar pola lubang pada template di kertas pencatatan.

4.3.1.2 Indikasi isi dari tiap-tiap lubang (sumur).

4.3.1.3 Beri tiap pola pada kertas pencatatan yang sesuai dengan jumlah dan ternpatnya pada slide.

4.3.2 Penambahan reagensia (lihat gambar 2).

4.3.2.1 Letakkan pengenceran yang sesuai dari anti-enterotoksin (antiserum) pada bagian tengah sumur, dan letakkan enterotoksi yang homogen pada bagian pinggir atas sumur (apabila pola diamond digunakan); letakkan material yang dalam pemeriksaan dalam sumur yang terdekat dengan sumur yang mengandung antitoksin acuan. Apabila sistim bivalent digunakan, letakkan toksin acuan lainnya dalam sumur dibawahnya.

4.3.2.2 Gunakan toksin acuan dan antitoksin yang sebelumnya telah disetarakan volumenya, pada konsentrasi yang memberikan garis-garis (jalur-jalur) endapan (hasil pengacuan) pada pertengahan sumur.

4.3.2.3 Sesuaikan pengenceran reagensia juga memberikan jalur-jalur endapan (hasil penguapan) yang lemah tetapi dapat dibedakan untuk sensitivitas maksimal (lihat 3.9 untuk petunjuk pemisahan reagensia).

4.3.2.4 Siapkan slide kontrol dengan hanya berisi toksin dan antitoksin acuan.

4.3.2.5 Isi sumur-sumur dengan reagensia sampai membentuk permukaan yang cembung, dengan menggunakan pipet Pasteur (dengan menusuk permukaan reagen dan menarik ke atas hingga berbentuk cembung dengan tabung gelas berdiameter 7 mm) atau pipet disposable berukuran 30 atau 40/μl).

4.3.2.6 Hilangkan gelembung-gelembung dari sumur dengan menggunakan gelas red; buat gelas red dari tabung gelas menjadi seperti pipet kapiler, patahkan menjadi sepanjang 2—2,5 inci dan lelehkan ujungnya dengan api.

4.3.2.7 Masukkan red ke dalam sumur untuk menghilangkan udara yang mungkin tidak terlihat dari luar dan berada di dalam.

4.3.2.8 Biarkan slide pada suhu ruang dalam petridish tertutup yang berisi busa lembab yang diletakkan selama 48—72 jam sehelumnya.

4.3.3 Pembacaan slide

4.3.4.1 Pindahkan talenan dengan menggesernya kesalah satu bagian.

4.3.3.2 Jika perlu, bersihkan slide dengan mencelupkan sebentar ke dalam air dan lap bagian bawah slide; kemudian warnai slide seperti di bawah ini.

4.3.3.3 Periksa slide dengan cukup penerangan dan latar belakang yang gelap. Periksa jalur-jalur endapan yang bertumpuk/tumbuh bersama-sama dengan acuan dari jalur-jalur endapan (lihat gambar 3). Apabila konsentrasi enterotoksin dalam tes material ada dalam jumlah banyak, pembentukan jalurjalur acuan akan terhambat, dan tes material harus diencerkan dan di tes kembali (lihat gambar 4, diagram 1 sebagai contoh dari jalur-jalur endapan yang terhambat karena produksi enterotoksin yang berlebihan dari hasil reaksi pada gambar 2 dan contoh pembentukan jalur-jalur dari hasil tes material yang telah diencerkan terlihat pada gambar 5).

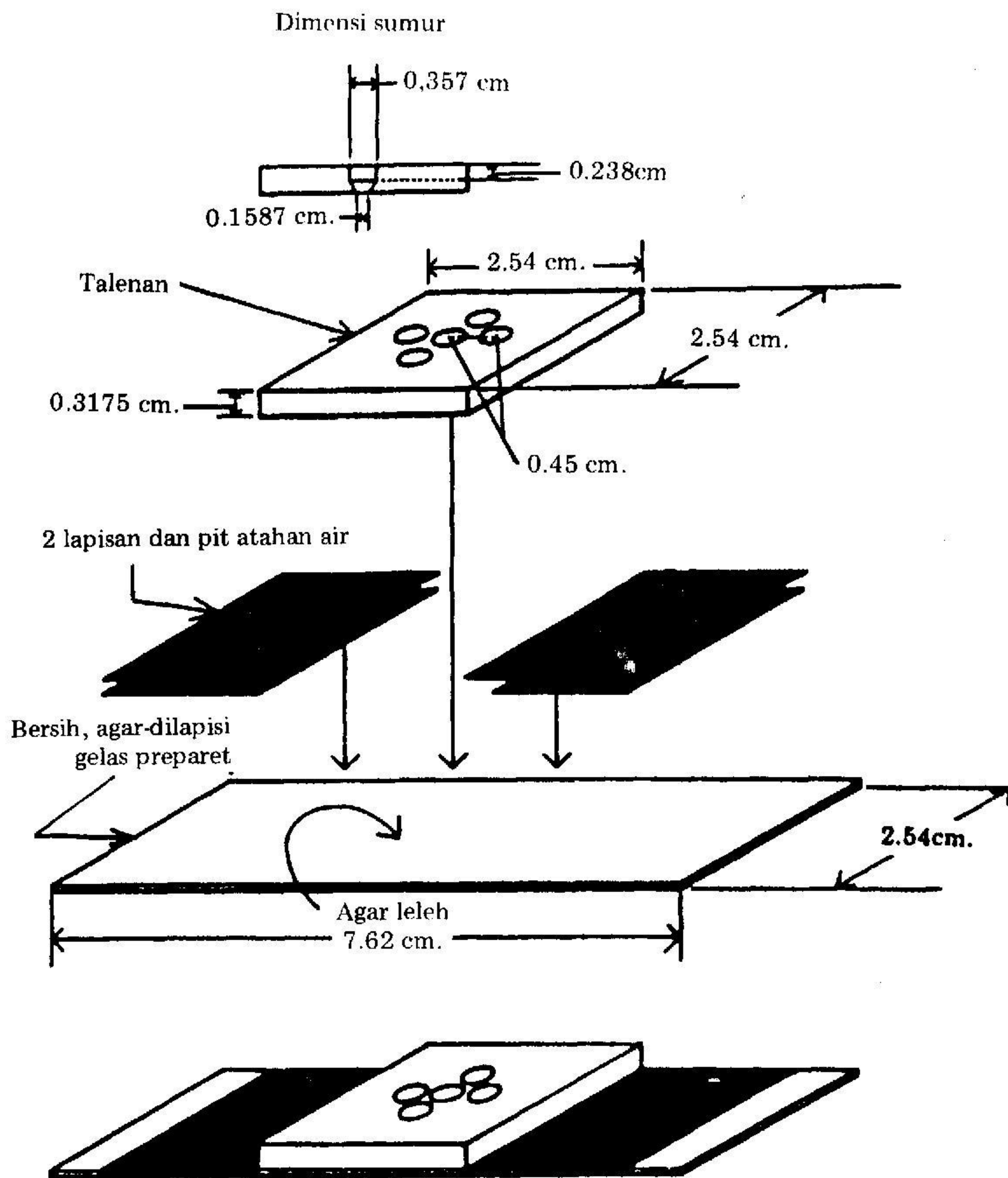
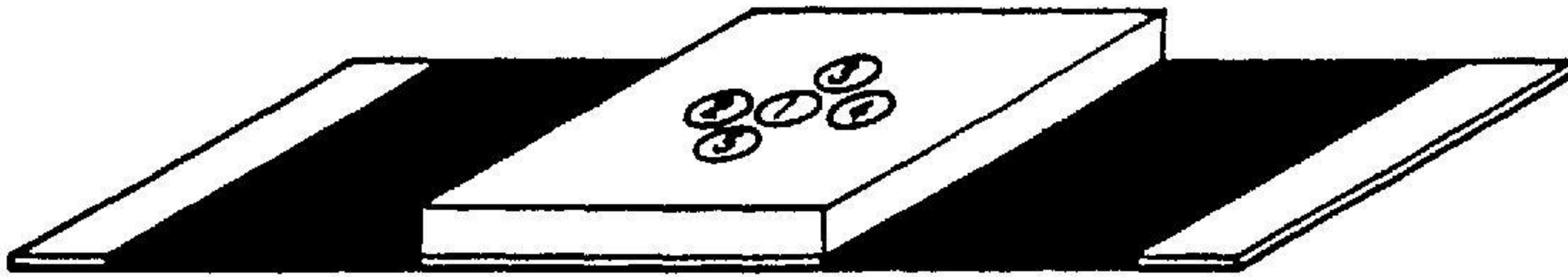
Biasanya, pada jalur-jalur endapan yang tidak biasa terbentuk akan menyulitkan pada pekerja yang helum berpengalaman. Satu dari beberapa pola jalur endapan yang tidak biasa terbentuk dapat berasal bukan dari toksin, tetapi disebabkan karena antigen lain dari material yang diuji. Contoh ini terlihat pada gambar 6.

4.3.4 Pewarnaan slide

4.3.4.1 Perjelas jalur-jalur endapan dengan mencelupkan slide pada thiazine Red R stain selama 5—10 menit (lihat 4.3.4.2), di hawah ini dan periksa. Perlakuan ini diperlukan apabila jalur-jalur endapan tidak dapat terlihat jelas.

4.3.4.2 Gunakan prosedur pewarnaan di hawah ini, apabila slide akan diawetkan (disimpan). Bilas (buang) larutan kimia yang tersisa pada slide dengan merendam dengan cepat pada air dan mencelupkannya selama 10 menit pada setiap larutan di hawah ini :

0,1% asam thiazine Red R dalam 1% asam asetat; 1% asam asetat; 1% asam asetat dan 1% asam asetat yang mengandung 1% gliserol.

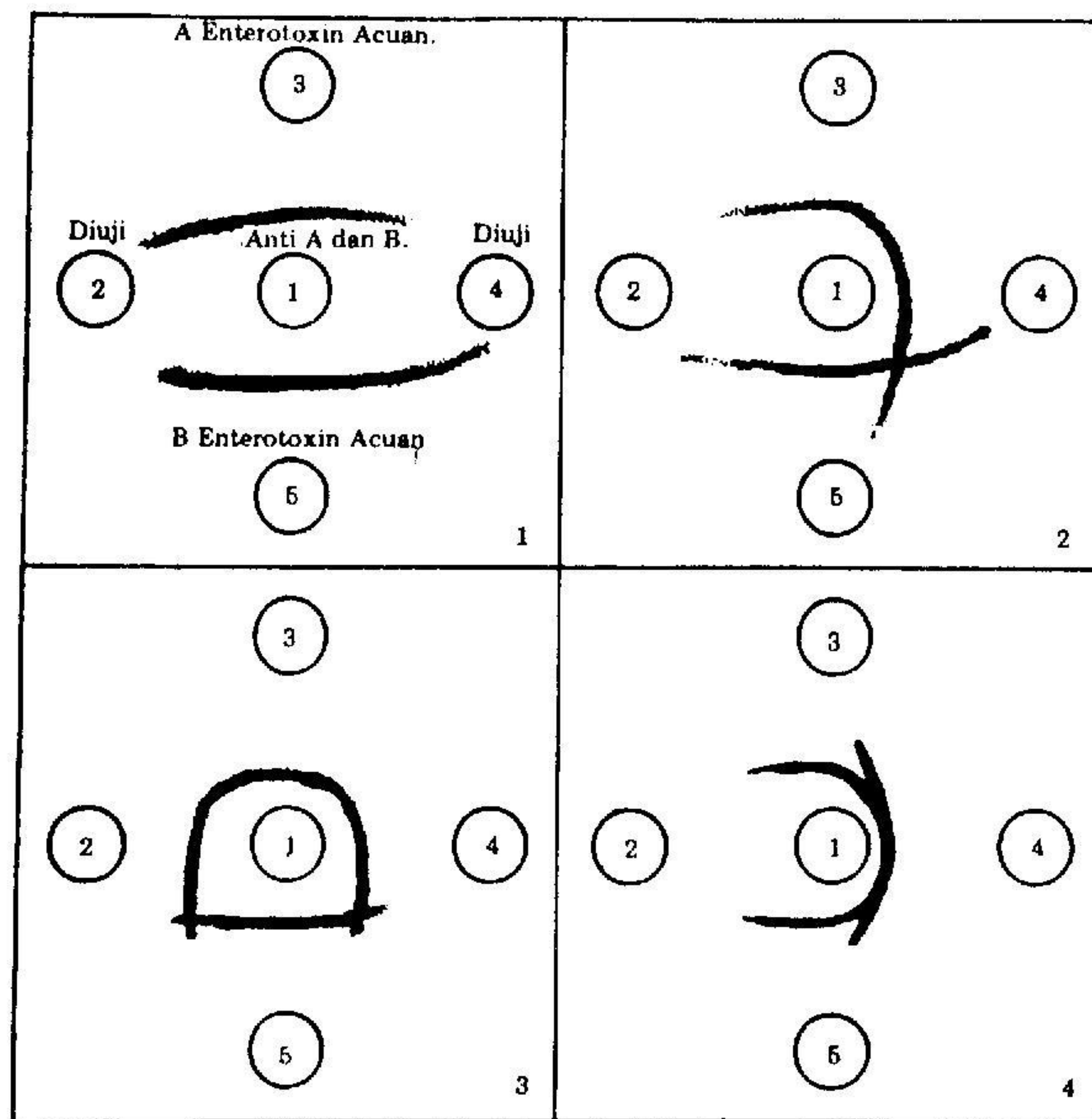
4.3.4.3 Tiriskan kelebihan larutan dari slide dan keringkan pada inkubator suhu 35° C, apabila ini akan disimpan. Setelah penyimpanan, jalur-jalur endapan tidak jelas terlihat, sampai slide dicelupkan dalam air.

Gambar 1
Gabungan mikro-slide dengan diagram untuk penyiapan dan spesifikasi untuk talenan plastik.

(1) Bivalen

1. Kombinasi antisera (misalnya, Anti A dan B).
2. Yang diuji
3. Enterotoksin acuan (misalnya, anti A).
4. Yang diuji
5. Enterotoksin acuan (misalnya, anti B).

(2) Monovalen

1. Antiserum (misalnya, Anti A).
2. Pengenceran bahan yang diuji.
3. Enterotoksin acuan (misalnya, jenis A).
4. Pengenceran bahan yang diuji
5. Pengenceran bahan yang diuji.

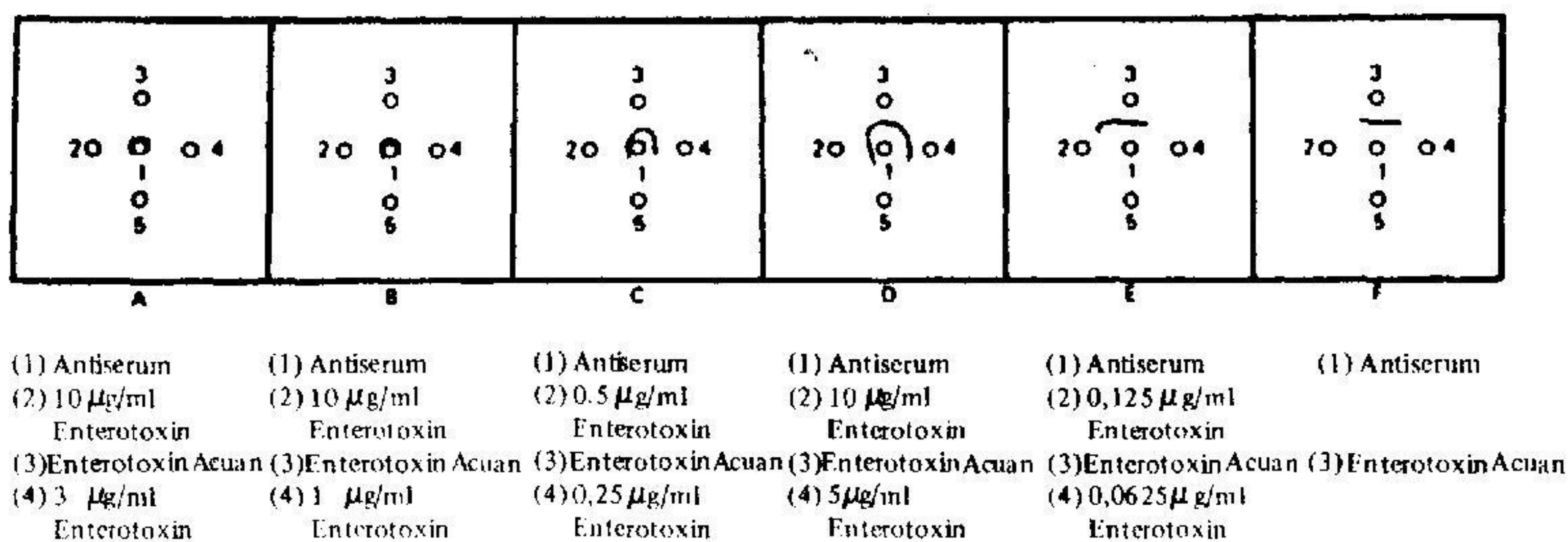
Gambar 2

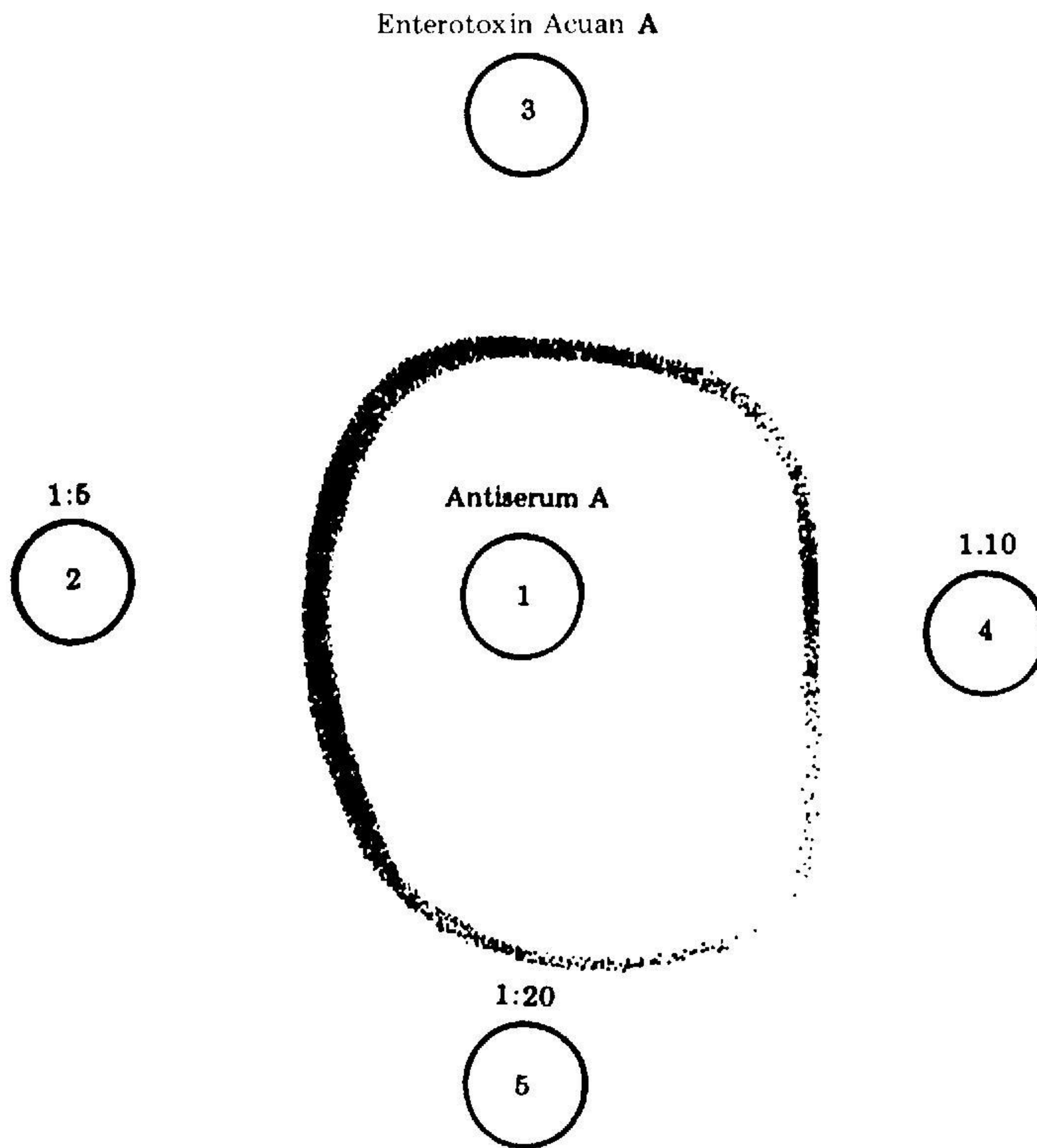
Pengaturan antiserum (antisera) dan homologous enterotoksin acuan ketika menentukan (1) contoh terhadap adanya 3 enterotoksin yang berbeda secara serologi yang mana pengajuan dilakukan hersamaan (sistim penentuan bivalen) atau 2 ketika menentukan pengenceran pada bahan yang diuji (sistim penentuan monovalen)

Gambar 3

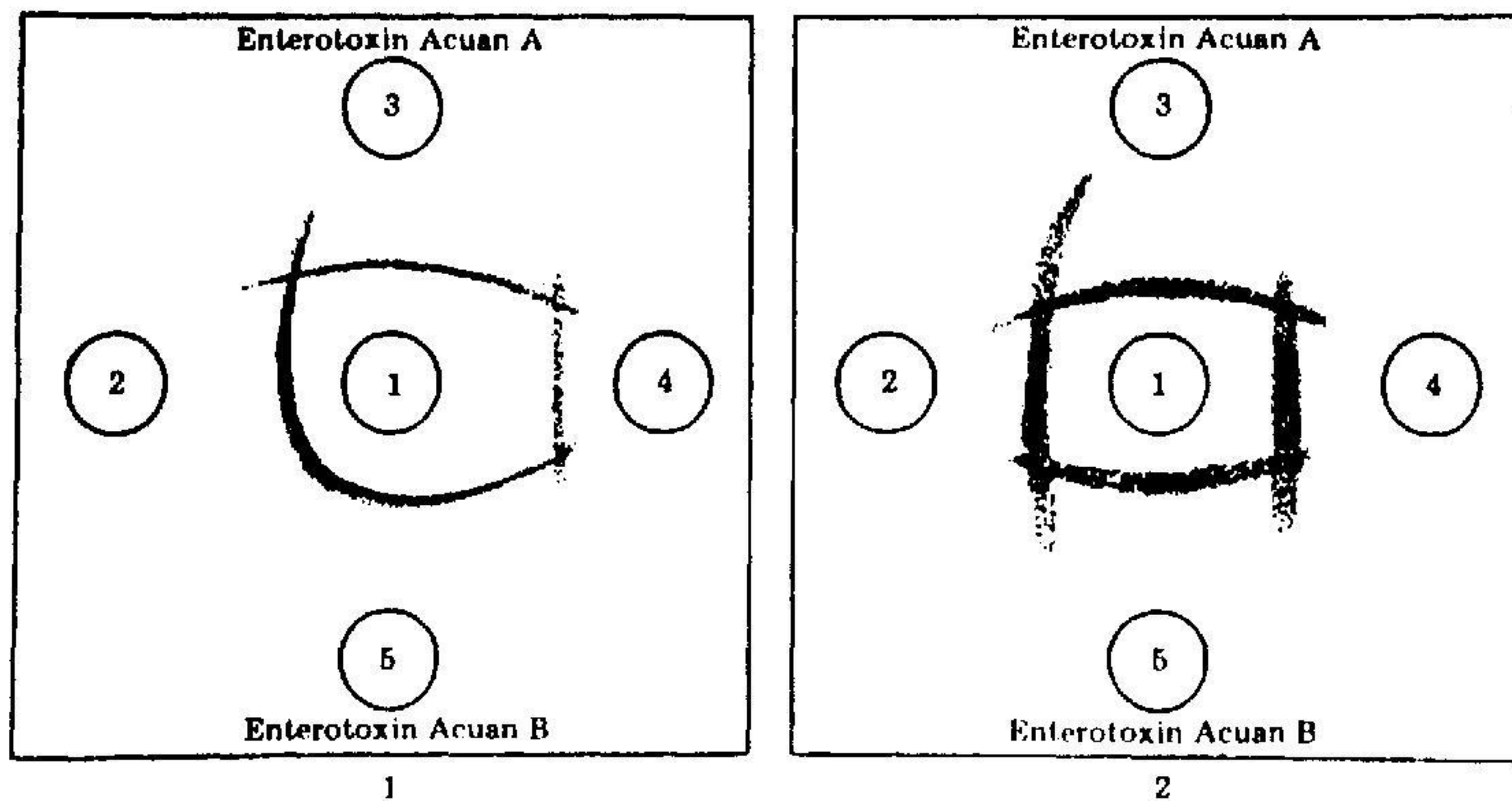
Tes microslide gel diffusion dengan sistem deteksi bivalen;

Antisera untuk enterotoksin A dan B pada sumur 1; enterotoksin acuan A dan B yang telah diketahui sebelumnya pada surnur 3 dan 5, memproduksi jalur-jalur acuan dari A dan B; bahan yang diujikan pada sumur 2 dan 4. Interpretasikan ke 4 reaksi seperti dihawah ini :

(1) tidak ada jalur yang terhentuk antara bahan yang diuji dan antisera tidak ada enterotoksin A dan B; (2) tumhuh bersamaan (pertumhuhan yang menumpuk) dari jalur yang diuji yang herasal dari sumur ke 4 dengan jalur enterotoksin A acuan

(perpotongan jalur bahan yang diuji dengan jalur enterotoksin B acuan) tidak ada enterotoksin A dan B pada sumur ke 2, adanya enterotoksin A dan tidak adanya enterotoksin B pada sumur ke 4; (3) adanya enterotoksin A dan tidak adanya enterotoksin B pada kedua bahan yang diujikan; dan (4) tidak adanya enterotoksin A dan B pada bahan yang diujikan di sumur ke 2, adanya enterotoksin A dan B pada sumur ke 4.

Gambar 4

Efek dari jumlah jalur enterotoksin dari bahan yang diuji pada pertumbuhan jalurjalur endapan basil penguapan acuan. Diagram A menunjukkan adanya hambatan (tekanan) dari jalur-jalur acuan apabila 10 dan 5 gr enterotoksin/ml digunakan. Diagram B — E menunjukkan pola endapan apabila enterotoksin dalam bahan yang diuji ada jumlah-jumlah yang sangat lebih sedikit. Diagram F menunjukkan formasi spesifik dari jalur-jalur endapan acuan yang diamati pada sistim kontrol pengujian slide.

Gambar 5

Pengujian Mikroslide Gel Double Diffusion sebagai sistim deteksi monovalen dimana berbagai pengenceran dari Kahan yang diujikan dianalisa terhadap adanya enterotoksin.

Gambar 6

Pola endapan (basil penguapan) pada tes mikroslide gel diffusion menggamharkan jalur-lajur endapan yang tidak spesifik yang disebabkan oleh reaksi antigen lain dengan non-spesifik yang disebabkan oleh reaksi antigen lain dengan non-enterotoksinantibodi. Pada pola endapan ke 1, bahan yang diujikan pada sumur 4 memproduksi reaksi non-spesifik yang ditunjukkan dengan jalur-jalur endapan yang tidak spesifik (jalur-jalur yang tidak dapat diidentifikasi dengan enterotoksin acuan A dan B) yang mana berpotongan dengan jalur-jalur enterotoksin acuan. Pada pola endapan ke 2, ke dua bahan yang diujikan (pada sumur ke 2 dan 4) memberikan basil negatif untuk enterotoksin A dan B tetapi memproduksi jalur-jalur endapan non-spesifik yang mana berpotongan dengan jalur-jalur endapan enterotoksin A dan B.

Lampiran I
MEDIA PEMBIAKAN

Beberapa formula media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersial tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktivitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuantujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme jika dibandingkan dengan formule aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisme terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisme kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang herhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisa yang tergantung pada karakterislik biokimia spesifik dari mikroorganisme.

1. Media Baird-Laker

Basal medium	
Tryptone	10 g
Beef extract	5 g
Yeast extract	1 g
Sodium pyruvate	10 g
Glycine	12 g
Lithium chloride, $6H_2$ 0	5 g
Agar	20g

Larutkan bahan dalam 950 ml aquadest.Didihkan hingga benar-berlarut.Bagikan tiap 95 ml larutan tersebut ke dalam hotol bertutup. Autoclve selama 15 menit dengan suhu 121°C. pH akhir 7,0 ± 0,2 pada suhu 25°C. Simpan tidak lebih dari satu bulan pada suhu 4 ± 1"C.

Pengkayaan — Lacto EY tellurite enrichment.

Complete medium . Tambahkan 5 ml pengkayaan yang telah dipanaskan kembali (45 - 50^0) ke dalam 95 ml basal medium leleh yang disesuaikan suhunya sampai 45 - 50°C. Aduk hingga homogen (hindarkan busa), tuang 15 - 18 ml ke dalam petridish steril dengan ukuran 15 x 100 mm. Simpan pada suhu 4 ± 1°C selama tidak lebih dari 48 jam sebelum digunakan. Medium harus disimpan dalam tempat yang bulat, jangan gunakan tempat lain. Keringkan media tersebut sebelum digunakan dalam metode-metode sehagai berikut :

a) dalam oven jenis konfeksi atau inkuhator sejenis selama 30 menit pada suhu 50°C, tanpa tutup dan permukaan agar menghadap ke bawah.
b) dalam oven atau inkubator dengan udara yang dihembus selama 2 jam pada suhu 50°C, tertutup dan permukaan agar menghadap ke atas.
c) dalam inkubator selama 4 jam pada suhu 35°C dengan tutup dan permukaan agar menghadap ke atas.
d) dalam laboratorium selama 16 - 18 jam pada suhu ruang, dengan tutup dan permukaan agar menghadap ke atas

2. Brain Heart Infusion Agar (0,77)

Siapkan jumlah yang sesuai untuk BHI broth. Sesuaikan pH 5,3 (untuk penentuan staph-enterotoksin dengan HCl 1N. Tambahkan agar untuk mendapatkan konsentrasi 0,7 Larutkan dengan pendidihan seminimal mungkin. Pindahkan 25 ml ke dalam tahung reaksi 25 x 200 mm. Autoclave pada suhu 121°C selama 10 menit.

3. Nutrient Agar

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15g
Aquadest	1liter

Panaskan hingga untuk melarutkan semua bahan. Bagikan ke dalam tabungtahung reaksi atau wadah lain, dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,8 ± 0,2. Apabila digunakan sehagai bahan dasar untuk blood agar, tarnbahkan 8 - 9 NaCl untuk mencegah terjadinya hemolisa dari sel-sel darah merah.

4. Staphylococcus Agar // 110

Gelatin	30,0 g
Triptycase peptone	10,0 g
Yeast extract	2,5 g
Lactosa	2,0 g
D-mannitol	10,0 g
Sodium chloride	75,0 g
Dipotassium phosphate	5,0 g

Agar	15,Og
Aquadest	1000 ml

Larutkan bahan di atas dalam 1 liter aquadest. Aduk hingga merata. Panaskan dengan pengadukan sampai mendidih selama 1 menit. pH akhir 7,0 ± 2,0. Pindahkan dalam tabung-tabung atau lahu-labu yang sesuai dan autoclave 121° C, 15 menit.